J South Med Univ, 2015, 35(1): 29-33 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.01.06

基础研究

高糖激活WNT信号通路促进血管平滑肌细胞钙化

颜建云[1],周 芹[2],于汇民[3],侯梦琳[4],陆立鹤[4]

[1]南方医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,广东 广州 510515;中山大学[2]附属第一医院麻醉科,[4]中山医学院病理生理学教研室,广东 广州 510080;[3]广东省人民医院心内科//广东省医学科学院广东省心血管病研究所,广东 广州 510080

摘要:目的 探讨高糖导致血管钙化机制是否与WNT信号通路有关。**方法** 采用体外血管钙化模型,高糖诱导血管平滑肌细胞钙化,检测WNT信号分子和骨相关蛋白Cbfa1,Osx,OCN,BMP2的表达以及细胞钙化程度。观察WNT信号抑制剂Dkk1对高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化和Cbfa1,Osx,OCN,BMP2表达的影响。**结果** 高糖能上调血管平滑肌细胞WNT信号通路分子包括Wnt3a,Wnt7a,Fzd4,Wisp1 mRNA的表达(1.86±0.15, 1.68±0.13, 2.10±0.17, 2.30±0.20, P<0.05),促进WNT信号通路关键分子β-catenin的磷酸化(2.70±0.22, P<0.05),激活WNT信号通路。使用WNT信号抑制剂Dkk1能减轻血管平滑肌细胞钙化,下调骨相关蛋白Cbfa1,Osx,OCN,BMP2 mRNA的表达[(51±9)%,(58±11)%,(56±10)%,(62±10)%,P<0.01)]。**结论** WNT信号通路参与了高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化。
关键词:血管钙化;WNT;高糖;β-catenin;血管平滑肌细胞

High glucose promotes vascular smooth muscle cell calcification by activating WNT signaling pathway

YAN Jianyun[1], ZHOU Qin[2], YU Huimin[3], HOU Menglin[4], LU Lihe[4]

[1]Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; [2]Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; [3]Department of Cardiology, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences and Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China; [4]Department of Pathophysiology, Zhongshan Medical School, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To investigate whether high glucose-induced vascular calcification is associated with WNT signaling pathway. **Methods** An *in vitro* model of human vascular smooth muscle cell (VSMC) calcification was induced by exposure of the cells to high glucose. The expressions of WNT signal molecules and bone-related proteins including Cbfa1, Osx, OCN and BMP2 were analyzed with qRT-PCR, and the cell calcification was assessed by alizarin red staining. The effect of Dkk1, a WNT signaling inhibitor, on high glucose-induced cell calcification was tested with alizarin red staining and calcium content analysis. **Results** High glucose activated WNT signaling pathway in human VSMCs by up-regulating the expressions of WNT signal molecules including Wnt3a, Wnt7a, Fzd4 and Wisp1 mRNA by 1.86, 1.68, 2.1, and 2.3 folds, respectively, and by promoting the phosphorylation of β-catenin (2.70±0.22, P<0.05), a key mediator of WNT signaling pathway. Inhibition of WNT signaling pathway by Dkk1 attenuated high glucose-induced VSMC calcification and down-regulated the expression of bone-related proteins Cbfa1, Osx, OCN, and BMP2 by (51±9)%, (58±11)%, (56±10)%, and (62±10)% (P<0.01). **Conclusion** WNT signaling pathway is involved in high glucose-induced VSMC calcification.
Key words: vascular calcification; WNT; high glucose; β-catenin; vascular smooth muscle cells

血管钙化是糖尿病患者的常见并发症,能增加心血管疾病的发病率和死亡率[1]。近年来的研究证明血管钙化是一种类似骨生成的主动调节过程,伴随着大量的骨相关蛋白如cbfa1、Osx、OCN、BMP2的表达上调[2-3]。既往的研究表明高糖能诱导体外血管平滑肌细胞(VSMCs)钙化[4-5]。然而,高糖诱导血管平滑肌细胞钙化的机制尚不明确。WNT信号通路是导致血管钙化的重要机制之一。已有研究报道WNT信号通路参与了血管钙化[6-7]。但是,WNT信号在高糖诱导的血管钙化中的作用并不清楚。本研究采用体外血管平滑肌细胞钙化模型,研究高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化的WNT信号机制,探讨糖尿病患者血管钙化形成的可能机制。

收稿日期:2014-08-21

基金项目:国家自然科学基金(81000124,81470488);中山大学高校基本科研业务费专项资金(11ykpy8);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目

Supported by National Natural Science Foundation of China (81000124, 81470488).

作者简介:颜建云,博士,副教授,电话:020-61648204,E-mail: yanjy790@163.com

通信作者:陆立鹤,副教授,电话:020-87330028,E-mail: lulihe@mail.sysu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

细胞培养试剂、p-nitrophenylphosphate、茜素红来自Sigma公司;Dkk1购自R&D;SYBR green试剂盒购自Applied Biosystems;TRIzol试剂购自Invitrogen;AMV逆转录酶购自Roche;BCA蛋白定量试剂盒、Western blot发光试剂盒购自Pierce;抗β-catenin和phospho-β-catenin(Ser675)抗体购自Cell signaling。

1.2 细胞培养

动脉来源于中山大学附属第一医院截肢手术病人,采用explant方法分离血管平滑肌细胞[8],将动脉切成1 mm的小块,置于含10%FBS的DMEM培养液中培养,每周更换培养液3次。细胞长满后,进行传代培养。取3~6代的细胞用来实验,细胞中分别加入5 mmol/L葡萄糖(阴性对照),25 mmol/L葡萄糖和25 mmol/L甘露醇(渗透压对照),WNT信号抑制剂Dkk1(25 ng/ml),培养7 d,观察细胞钙盐沉积和骨相关蛋白的表达。

1.3 钙化检测

去除细胞培养液,PBS溶液洗细胞3次后,用4%的甲醛常温下固定细胞10 min,加入2%茜素红(pH 4.2)溶液染色5 min,去离子水洗涤细胞,显微镜下观察细胞染色情况并拍片。血管切片的茜红素染色:常规石蜡切片,脱蜡后水化,2%茜素红溶液染色5 min,丙酮脱水后封片拍照。采用邻甲酚酞络合剂的方法测定细胞钙离子浓度[9]。

1.4 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)活性

用PBS洗涤细胞3次后,用0.1% Triton X-100裂解细胞抽取蛋白,离心后取上清液,用BCA法测定样品的蛋白含量。然后将180 μl p-nitrophenylphosphate (p-NPP)反应底物加入样品,37 ℃反应15 min,加入3 mol/L NaOH终止反应,用分光光度计于405 nm处测定溶液吸光度D值。

1.5 荧光定量qRT-PCR

参照TRIzol试剂说明书,采用TRIzol提取VSMCs的总RNA。测定RNA的浓度,取1 μg RNA,加入AMV逆转录酶将mRNA反转录为cDNA,然后用SYBR green试剂盒配制成20 μl PCR反应体系,在7900 HT Fast Real-Time PCR仪上进行荧光定量PCR。以β-actin作为内参,用△△Ct的方法计算基因mRNA表达的相对量。PCR所用的引物见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primer sequence for qRT-PCR

Genes	Forward primer	Reverse primer
β-actin	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
Wnt3a	ACTACGTGGAGATCATGCCC	ATGAGCGTGTCACTGCAAAG
Wnt7a	AGAGAAGCAAGGCCAGTACC	CCGTGGCACTTACATTCCAG
Fzd4	GCCAATGTGCACAGAGAAGA	GGTTTTGTGAGGTAAGGGCA
Wisp1	CTCCAATGTTAACGCCCAGT	AAGTTCATGGATGCCTCTGG
Cbfa1	ACGATCTGAGATTTGTGGGC	TTCCCGAGGTCCATCTACTG
OCN	GTAGTGAAGAGACCCAGGCG	TCAGCCAACTCGTCACAGTC
Osx	TAATGGGCTCCTTTCACCTG	CACTGGGCAGACAGTCAGAA
BMP2	GCTAGACCTGTATCGCAGGC	AAACTCCTCCGTGGGGATAG

1.6 Western blot检测蛋白的表达

收集VSMCs,用PBS洗3次后,加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS)提取细胞总蛋白,离心后取上清,用BCA法测定样品蛋白浓度。加热蛋白变性后上样,10%SDS-PAGE胶进行电泳分离总蛋白,湿转法将蛋白转至硝酸纤维素膜,室温下脱脂奶粉封闭1 h。加抗β-catenin抗体(1:1000)、抗phospho-β-catenin(Ser675)抗体(1:1000)室温孵育1 h,TBST洗膜3次,然后加HRP标记的二抗室温孵育1 h,TBST洗膜后ECL发光,暗室胶片显影。

1.7 统计学处理

每次实验至少重复3次,计量资料以均数±标准差表示,采用SPSS软件分析数据,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05被认为有差异统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病患者的钙化血管WNT信号通路上调

茜红素染色显示糖尿病患者(DM)的动脉血管出现明显的钙化,非糖尿病患者(NDM)的动脉未检测到钙化(图1A)。与非糖尿病患者组比较,糖尿病患者的动脉WNT信号通路分子包括Wnt3a, Wnt7a, Fzd4, Wisp1的mRNA表达明显增加(图1B)。

2.2 高糖激活血管平滑肌细胞WNT信号通路

与正常糖组(NG)比较,高糖组(HG)血管平滑肌细胞WNT信号通路分子包括Wnt3a, Wnt7a, Fzd4, Wisp1

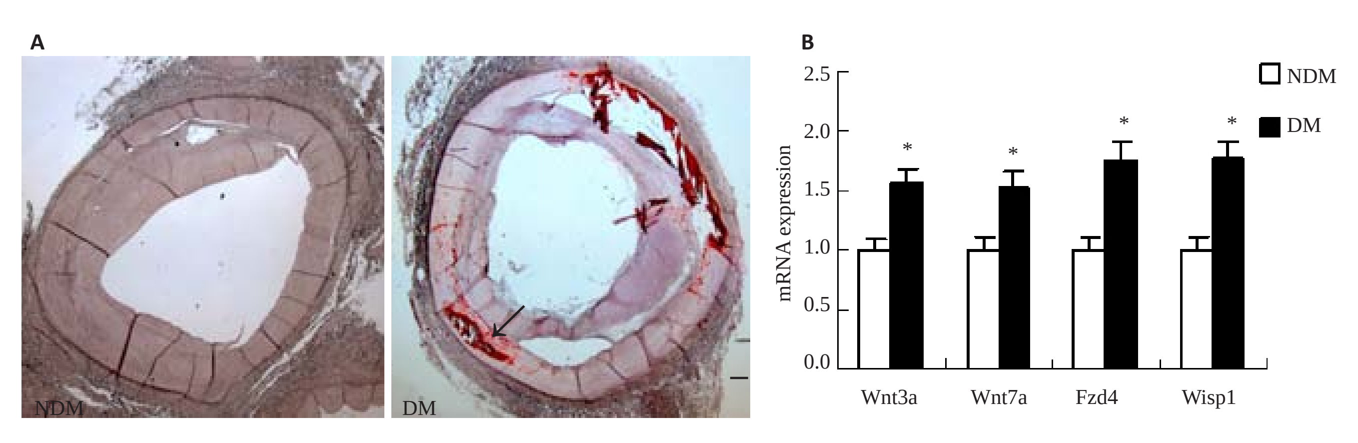


图1 钙化血管WNT信号分子的表达

Fig.1 Expression of WNT signaling molecules in calcified arteries. *A*: Calcification assessed by Alizarin red staining. *B*: Expression of WNT signaling molecules analyzed by qRT-PCR. *$P<0.05$, Scale bar=100 μm.

的mRNA表达明显增加，而甘露醇高渗透压对照组(OC)并没有变化(图2A)。另外，高糖能明显地促进血管平滑肌细胞WNT信号通路关键分子β-catenin的磷酸化，激活WNT信号通路，而甘露醇并不能刺激β-catenin的磷酸化(图2B)。

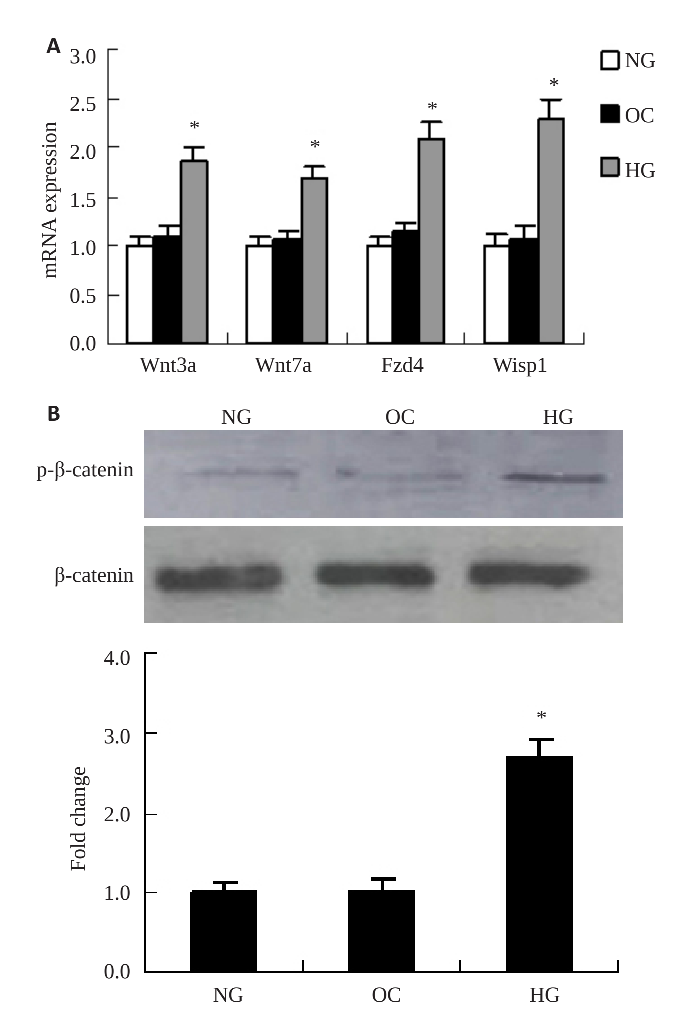


图2 高糖对血管平滑肌细胞WNT信号的影响

Fig.2 Effect of high glucose on WNT signals in vascular smooth muscle cells. *A*: Expression of WNT signaling molecules was analyzed by qRT-PCR. *B*: β-catenin expression was analyzed by Western blotting. *$P<0.05$

2.3 高糖诱导血管平滑肌细胞骨相关蛋白的表达

与正常糖组比较，高糖组血管平滑肌细胞骨相关蛋白包括Cbfa1，Osx，OCN，BMP2的mRNA表达明显增加，而甘露醇没有诱导这种变化(图3A)。另外，高糖能明显增加血管平滑肌细胞成骨样分化分子标志物ALP的活性，而甘露醇不能提高ALP的活性(图3B)。

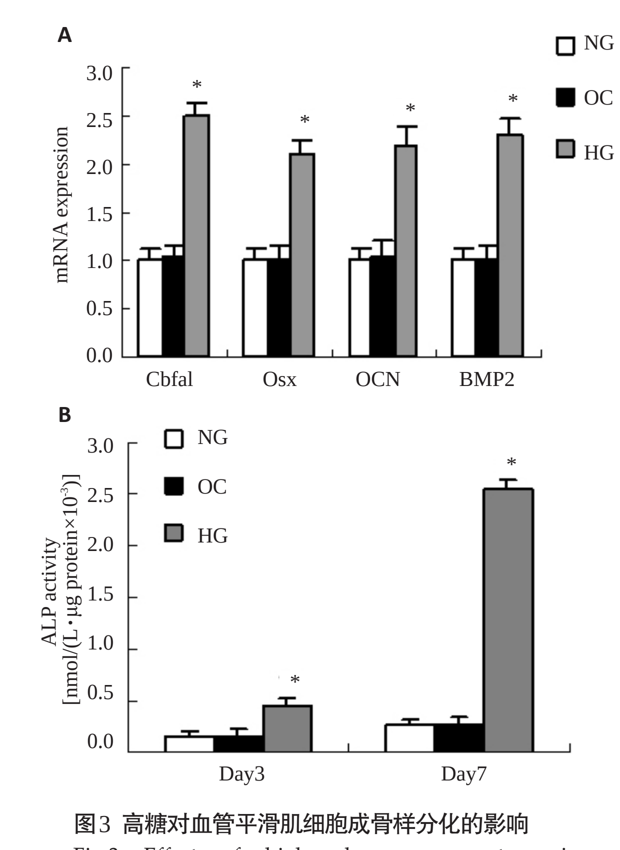


图3 高糖对血管平滑肌细胞成骨样分化的影响

Fig.3 Effect of high glucose on osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *A*: Expression of bone-related proteins analyzed by qRT-PCR. *B*: ALP activity assessment. *$P<0.01$.

2.4 WNT信号抑制剂Dkk1减轻高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化

为了研究WNT信号在高糖诱导的血管平滑肌细

胞钙化的作用,我们观察了WNT信号抑制剂Dkk1对高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化的作用。茜红素染色显示Dkk1处理血管平滑肌细胞7 d后,高糖诱导的钙化明显减轻(图4A)。与对照组比较,Dkk1组细胞的钙离子浓度明显降低(图4B)。

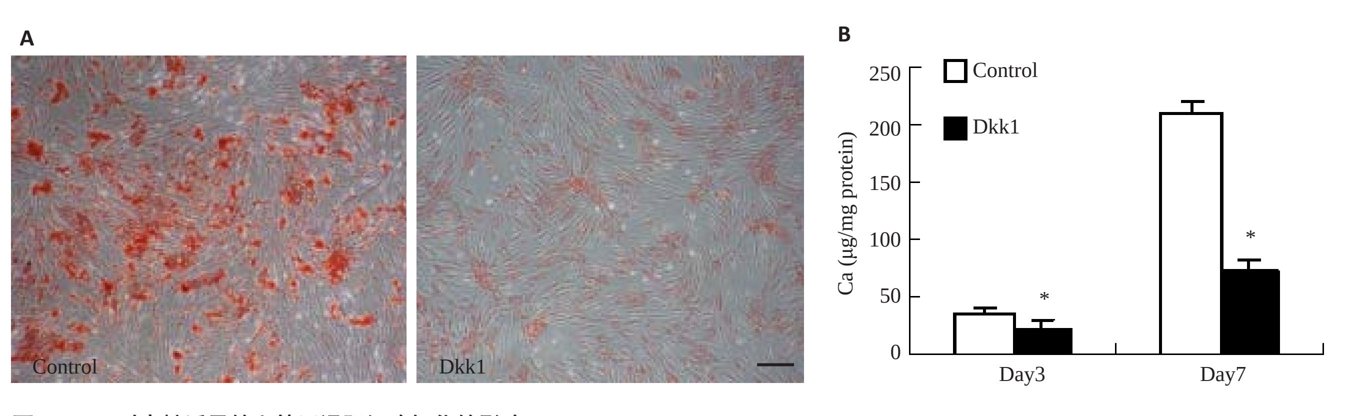
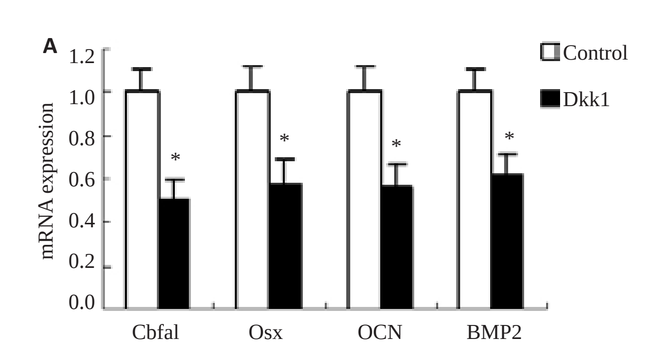


图4 Dkk1对高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化的影响

Fig.4 Effect of Dkk1 on vascular smooth muscle cell calcification induced by high glucose. *A*: Calcification assessed by Alizarin red staining. *B*: Quantitative analysis of calcium content. *P<0.01 *vs* control. Scale bar=100 μm.

2.5 WNT信号抑制剂Dkk1下调血管平滑肌细胞骨相关蛋白

我们还观察了Dkk1对高糖诱导的血管平滑肌细胞骨相关蛋白表达的影响。与对照组比较,Dkk1组血管平滑肌细胞骨相关蛋白包括Cbfa1,Osx,OCN,BMP2的mRNA表达明显下降(图5A)。此外,Dkk1能明显降低血管平滑肌细胞ALP的活性(图5B)。



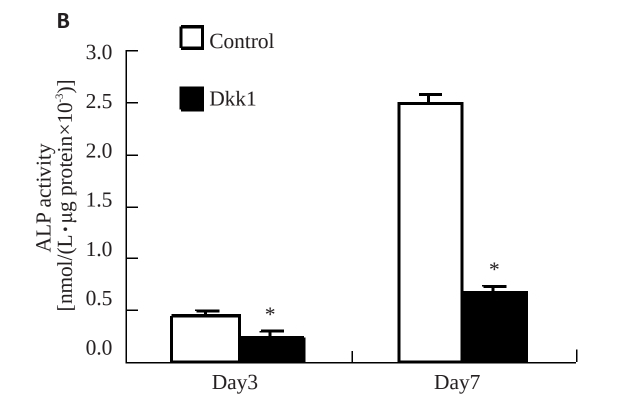


图5 Dkk1对血管平滑肌细胞成骨样分化的影响

Fig.5 Effect of Dkk1 on osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cell induced by high glucose. *A*: Expression of bone-related proteins analyzed by qRT-PCR. *B*: ALP activity assessment. *P<0.01 *vs* control.

3 讨论

血管钙化是一种受基因调节的主动过程,与骨生成的过程类似。血管平滑肌细胞是参与血管钙化的主要细胞来源[10]。当血管平滑肌细胞受到氧化应激、高糖等刺激因素的作用后,可分化成为成骨样细胞,分泌大量的骨相关蛋白如ALP、cbfa1、OCN和BMP2等,从而诱导细胞钙化[11-12]。本研究发现:高糖能促进血管平滑肌细胞钙化,上调骨相关蛋白Cbfa1、Osx、OCN和BMP2的表达和增加成骨样分化分子标志物ALP的活性。此外,我们还发现:高糖激活血管平滑肌细胞Wnt信号通路,而使用Wnt信号通路Dkk1抑制剂明显减弱高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化和成骨样分化,提示Wnt信号通路参与了高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化。

已有研究证明高糖参与了血管钙化过程。相较于非糖尿病患者,糖尿病患者的动脉钙化明显增加,钙相关蛋白的表达上调[12]。此外,体外实验证明:高糖能增加骨相关蛋白cbfa1、OCN、BMP2的表达,提高ALP的活性,促进VSMC钙化[12-13],但其导致血管钙化的机制不明确。我们的研究也发现高糖能明显上调骨相关蛋白包括Cbfa1、Osx、OCN、BMP2的表达,促进人的血管平滑肌细胞钙化。另外,糖尿病患者的动脉WNT信号通路分子包括Wnt3a、Wnt7a、Fzd4、Wisp1的mRNA表达明显增加。体外实验证明:高糖能上调血管平滑肌细胞Wnt3a、Wnt7a、Fzd4、Wisp1的mRNA表达,明显地促进血管平滑肌细胞WNT信号通路关键分子β-catenin的磷酸化,提示高糖诱导的血管钙化可能与WNT信号通路有关。

WNT蛋白家族是进化上高度保守的分泌型糖蛋白,在胚胎发育过程中调节细胞的增殖和分化。WNT

信号异常可导致肿瘤，骨质疏松，糖尿病等疾病。经典WNT信号通路通过WNT配体结合其受体Frizzled（FZD）和Receptor-related proteins 5 and 6（LRP5 and LRP6），形成WNT-FZD-LRP复合物，稳定关键分子β-catenin,进入细胞核与T cell factor/lymphoid enhancer factor（TCF/LEF）形成复合物，激活下游靶基因的表达[13]。体外实验证明：WNT/β-catenin信号通路参与了血管平滑肌细胞钙化[14-15]。我们的研究发现WNT信号通路抑制剂Dkk1能明显抑制高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化。此外，Dkk1能降低血管平滑肌细胞ALP的活性和下调骨相关蛋白Cbfa1、Osx、OCN和BMP2的表达。综上所述，我们的研究表明：高糖刺激血管平滑肌细胞，激活WNT信号通路，上调骨相关蛋白Cbfa1、Osx、OCN和BMP2的表达，从而诱导血管平滑肌细胞出现成骨样分化，最终导致血管平滑肌细胞钙化。因此，WNT信号通路是介导高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化的重要机制，可能成为干预糖尿病患者血管钙化的有效靶点。

参考文献：

[1] Raggi P, Shaw LJ, Berman DS, et al. Prognostic value of coronary artery Calcium screening in subjects with and without diabetes[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(9): 1663-9.

[2] Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease[J]. Circulation, 2008, 117(22): 2938-48.

[3] Tyson KL, Reynolds JL, Mcnair R, et al. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(3): 489-94.

[4] Liu F, Zhong H, Liang JY, et al. Effect of high glucose levels on the calcification of vascular smooth muscle cells by inducing osteoblastic differentiation and intracellular Calcium deposition *via* BMP-2/Cbfα-1 pathway[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2010, 11(12): 905-11.

[5] Wang YY, Shan JG, Yang WA, et al. High mobility group box 1 (HMGB1) mediates High-Glucose-Induced calcification in vascular smooth muscle cells of saphenous veins[J]. Inflammation, 2013, 36 (6): 1592-604.

[6] Beazley KE, Deasey S, Lima FA. Transglutaminase 2-Mediated activation of beta-Catenin signaling has a critical role in Warfarin-Induced vascular calcification[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(1): 123-U302.

[7] Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, et al. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals[J]. J Clin Invest, 2005, 115(5): 1210-20.

[8] Endlich N, Endlich K, Taesch N, et al. Culture of vascular smooth muscle cells from small arteries of the rat kidney[J]. Kidney Int, 2000, 57(6): 2468-75.

[9] Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, et al. Parathyroid hormone-related peptide as a local regulator of vascular calcification. Its inhibitory action on in vitro calcification by bovine vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(6): 1135-42.

[10] Speer MY, Yang HY, Brabb T, et al. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries[J]. Circ Res, 2009, 104(6): 733-41.

[11] Yan J, Stringer SE, Hamilton A, et al. Decorin GAG synthesis and TGF-β signaling mediate Ox-LDL-induced mineralization of human vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(3): 608-15.

[12] Chen NX, Duan D, O'neill KD, et al. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells[J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21 (12): 3435-42.

[13] Clevers H, Nusse R. Wnt/β-Catenin signaling and disease[J]. Cell, 2012, 149(6): 1192-205.

[14] Beazley KE, Deasey S, Lima F, et al. Transglutaminase 2-mediated activation of β-catenin signaling has a critical role in warfarin-induced vascular calcification[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(1): 123-30.

[15] Faverman L, Mikhaylova L, Malmquist J, et al. Extracellular transglutaminase 2 activates beta-catenin signaling in calcifying vascular smooth muscle cells[J]. FEBS Lett, 2008, 582(10): 1552-7.

（编辑：吴锦雅）